

Efecto del ácido giberélico en la propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, “estevia”

Effect of gibberellic acid in the *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, “stevia”

Eloy López Medina, Angélica López Zavaleta & Anthony De la Cruz Castillo

Laboratorio de Biotecnología del Instituto de la Papa y Cultivos Andinos, Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II, Trujillo, PERÚ.

seellome88@gmail.com

angylz@outlook.es

jdelaacruzcastillo@hotmail.com



Resumen

Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni (Asteraceae), conocida como "estevia", es una planta herbácea originaria del suroeste de Brasil y Paraguay y cultivada en muchos países del mundo debido a que contiene un esteviosido utilizado como edulcorante, el cual no se metaboliza en nuestro organismo, por tanto, no eleva el nivel de glucosa en la sangre. Se propaga vegetativamente por esquejes, método sencillo pero no suficiente para implementar sistemas de propagación masiva ya que su propagación por semillas solo se hace con fines de investigación, motivo por el cual nos proponemos implementar el método de micropropagación *in vitro* aplicando diferentes concentraciones de ácido giberélico y así lograr mediante esta tecnología un sistema de propagación masiva de alta calidad genética y fitosanitaria, a bajos costos y en cantidades suficientes para abastecer las necesidades. Las plantas madres utilizadas procedieron del Laboratorio de Biotecnología del Instituto de la Papa y Cultivos Andinos de la Universidad Nacional de Trujillo. Se utilizaron segmentos nodales con una yema y se cultivaron en M & S, 1962 suplementado con 0,00; 0,50 y 1,00 ppm de ácido giberélico, los cuales constituyeron los tratamientos. Se analizó el efecto de estas concentraciones en los parámetros altura de plántula, número de raíces y raíz más desarrollada. El análisis de varianza aplicado no encontró diferencias significativas entre estos tratamientos y para los parámetros analizados, concluyendo que, a las concentraciones trabajadas, el ácido giberélico no ejerce ningún efecto, pudiéndose micropropagar *S. rebaudiana* por segmentos nodales sin la presencia de este fitorregulador.

Palabras clave: *Stevia rebaudiana*, micropropagación, ácido giberélico.

Abstract

Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni (Asteraceae), known as "stevia", is a herbaceous plant, native from southwestern Brazil and Paraguay and cultivated in many countries of the world because contains a stevioside used as a sweetener which is not metabolized in our organism, therefore, it does not increased the glucose level in blood. It is propagated vegetatively by cuttings, a simple but not sufficient method to implement systems of mass propagation since its propagation by seeds is only done for research purposes, reason why we propose to implement the method of *in vitro* micropropagation by applying different concentrations of gibberellic acid and then to achieve by means of this technology a mass propagation system of high genetic and phytosanitary quality, at low costs and in quantities sufficient to supply the requirements. The mother plants used came from the Biotechnology Laboratory of the Potato and Andean Crops Institute of the National University of Trujillo. Nodal segments were used with a bud and cultivated in M & S, 1962 supplemented with 0.00, 0.50 and 1.00 ppm of gibberellic acid, which constituted the treatments. The effect of these concentrations on the parameters seedling height, number of roots and most developed root was analyzed. The analysis of variance applied did not find significant differences between these treatments and for the analyzed parameters, concluding that, at the concentrations essayed, gibberellic acid does not exert any effect, so it is possible to micropropagate *S. rebaudiana* by nodal segments without the presence of this phyto regulator.

Keywords: *Stevia rebaudiana*, micropropagation, gibberellic acid.

Citación: López, E.; A. López & A. De la Cruz. 2017. Efecto del ácido giberélico en la propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, "estevia". *Arnaldoa* 24(2): 599-608. doi: <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.242.24211>

Introducción

Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni, conocida comúnmente como "estevia", "ka'a he'è" (en guaraní, hierba dulce), "hoja dulce" (Durán *et al.*, 2012; Herrera *et al.*, 2012; Jarma, 2010; Jeria & Pozo, 2011; Martínez *et al.*, 2016; Quezada, 2011; Salvador *et al.*, 2014), es una especie medicinal originaria del suroeste de Brasil y Paraguay (Durán *et al.*, 2012; Herrera *et al.*, 2012; Jarma, 2010; Oviedo *et al.*, 2015; Salvador *et al.*, 2014).

Es una planta herbácea, perteneciente a la familia Asteraceae, presenta tallo erecto, subleñoso; durante su desarrollo inicial no posee ramificaciones, tornándose multicaule después del primer ciclo vegetativo, llegando a producir hasta 20 tallos en tres a cuatro años; puede alcanzar hasta 90 cm de altura en su hábitat natural y en los trópicos puede llegar a tener alturas superiores a 100 cm., raíz pivotante, filiforme, no profundiza distribuyéndose cerca de la superficie, hojas de forma elípticas, ovales o lanceoladas, algo pubescentes; presentan disposición opuesta en sus estados juveniles, y alternas cuando las plantas llegan a su madurez fisiológica, previa a la floración, la flor es hermafrodita, pequeña y blanquecina; su corola es tubular, pentalobulada, en capítulos pequeños terminales o axilares, agrupados en panículas corimbosas, es autoincompatible, por lo que la polinización es entomófila; se dice que es de tipo esporofítico y clasificada como apomítica obligatoria, el fruto es un aquenio que puede ser estéril o fértil y diseminado por el viento, se clasifica como una planta de día corto, situando el fotoperíodo crítico de 12 a 13 horas según el ecotipo (Herrera *et al.*, 2012; Jarma, 2010; Landázuri & Tigrero, 2009; Martínez, 2015; Quezada, 2011).

Actualmente su cultivo se ha extendido a muchos países, entre ellos, Japón, China,

Taiwán, Tailandia, Indonesia, Filipinas, Australia, Rusia, Ucrania, Kazajstán, Malasia, Indonesia y América Latina (Martínez *et al.*, 2016; Oviedo *et al.*, 2015).

No existe uniformidad de criterios en requerimientos de suelo; en su estado natural crece en suelos de baja fertilidad, ácidos, de tipo arenoso, orgánicos y de alta humedad. La planta es rústica y poco exigente en lo que a composición y humedad del suelo se refiere. La tierra ideal es la areno-arcillosa con regular proporción de humus, se adapta bien a suelos arcillosos con buen drenaje, no así en lugares con exceso de humedad. Naturalmente crece a pH entre 4 a 5, pero crece mejor si los suelos tienen pH entre 6.5 a 7.5, siempre que no sean salinos (Salazar, 2014; Taiariol & Molina, 2010).

"No tiene efectos tóxicos y, por el contrario, es saludable, gracias a una gran experiencia y según el estudio del Dr. Rebaudi" (Meienberg *et al.*, 2015). En 1997 purificaron el extracto de estevia obteniendo un esteviósido, como un polvo blanco y altamente higroscópico, por lo cual hay que mantenerlo en un envase hermético para evitar la humedad y parece tener muy poca o ninguna toxicidad aguda. Del mismo modo, el consumo crónico de este esteviósido se cree que representa poco riesgo basado en los estudios en humanos. En 1985 mostraron que el consumo oral del esteviósido en cantidades elevadas como 550 mg/kg de peso corporal al día (es decir 200 veces la ingesta máxima probable de alrededor de 2 mg/kg/peso corporal/día por 2 años), no tuvo efectos tóxicos o cancerígenos en ratas. Sin embargo los efectos farmacológicos son sugeridos por otros estudios, como la reducción de la presión arterial y los niveles de glucosa en sangre. Además, el metabolito de la aglicona, el esteviol, se informó que es mutagénico y bactericida en *Salmonella*

typhimurium TM677. Por lo tanto, los efectos biológicos e interacciones adversas con fármacos se desconocen. (Durán *et al.*, 2012).

Ante la creciente demanda de productos bajos en calorías o sin calorías, la estevia ha tomado un sitio muy importante en la canasta familiar, se emplea como edulcorante de mesa, en la elaboración de bebidas, dulces, mermeladas, chicles, en pastelería, confituras, yogures, entre otros. Pero además de sus propiedades endulzantes, tiene importantes efectos sobre la salud. Recientemente fue aprobado para su utilización comercial por el Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives (Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives, 2005), y más recientemente la aprobación como Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS por sus siglas en inglés) de la Food and Drug Administration. El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) en sus reuniones 68ª y 69ª del año 2008, estableció una Ingestión Diaria Admisibles (IDA) para los glucósidos de Esteviol de 0–4 mg por kg de peso corporal por día, expresada como Esteviol. Los glucósidos de Esteviol son una mezcla de componentes de diferentes pesos moleculares. Dado que el componente activo efectivo es la parte de Esteviol de las distintas moléculas, la IDA se refiere al peso molecular del total de Esteviol presente en la mezcla (Durán *et al.*, 2012; Salvador *et al.*, 2014).

La planta se propaga principalmente por semillas que resultan de la polinización cruzada, que implica recombinación genética y, por lo tanto, alta heterogeneidad en cuanto al crecimiento y la producción de steviósidos (Alvarenga & Salazar, 2015; Martínez, 2015), es difícil debido a los bajos

porcentajes de germinación, dificultad para cosechar la semilla y los altos grados de variabilidad genética. La producción de plántulas a través de semilla se realiza en almácigos convencionales, similares a los de otras hortalizas, pero con algunas recomendaciones y prácticas especiales, como poner cobertura inmediatamente después de sembrar, con una tela fina, para evitar que las semillas sean arrastradas por el viento. Por todos los inconvenientes que se han analizado, la propagación por medio de acenios es útil para el mejoramiento genético, pero no para cultivos comerciales. Debido a la alta heterogeneidad de las plantas obtenidas a través de semillas, la propagación agámica es la mejor, ya que conserva las características de la planta madre. Se ha recurrido a la reproducción asexual mediante estacas para tratar de obtener materiales homogéneos; sin embargo, el hábito de crecimiento y el tamaño limitado de la planta hacen la propagación por estacas lenta e ineficiente para producir grandes cantidades, y se obtiene bajo número de individuos por planta (Alvarenga & Salazar, 2015; López *et al.*, 2016; Suarez & Quintero, 2014; Vázquez *et al.*, 2014).

El cultivo de tejidos es otro método de propagación vegetativa que permite plantaciones más uniformes en cuanto a su crecimiento y producción de steviósidos; además, se obtiene una rápida multiplicación clonal, que ha mostrado ser un método que garantiza alta eficiencia y gran estabilidad genética en las plantas producidas (Suarez & Quintero, 2014; Vázquez *et al.*, 2014). En la actualidad, la micropropagación o propagación *in vitro*, se está aplicando con gran éxito en una gran gama de cultivos hortícolas, ornamentales, frutales y forestales (Oviedo *et al.*, 2015), se define como cualquier procedimiento

aséptico que comprenda la manipulación en las plantas de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas "limpias", contrario a la propagación vegetativa no aséptica o convencional (Martínez, 2015). Las ventajas de la micro propagación, en comparación con sistemas convencionales, son el incremento acelerado del número de plantas, la disminución del tiempo de multiplicación, un mayor número de plantas por superficie utilizada, el mayor control de la sanidad, el fácil transporte para intercambio internacional de materiales y la posibilidad de multiplicar rápidamente especies en peligro de extinción (Martínez, 2015; Vásquez, 2012).

Las giberelinas son hormonas de crecimiento, cuyo efecto más notable es inducir crecimiento en longitud, su estructura básica está constituida por un anillo de ent-giberelano, algunos de los cuales poseen actividad hormonal. Pueden

actuar como reguladores endógenos del crecimiento controlando diversos procesos del desarrollo de las plantas, tales como la germinación, la elongación del tallo, la expansión de las hojas, el desarrollo de los tricomas y la inducción de flores y frutos. Al respecto, mencionan que las GAs controlan aspectos importantes en el desarrollo de las plantas, actuando como estimulantes del crecimiento, por lo que se obtiene un mayor tamaño. Una de las funciones más importantes de las GAs es la promoción del crecimiento del tallo, hojas y raíces, esto se debe a la inducción de la división celular, pues acortan la interface del ciclo celular al inducir a las células a sintetizar ácido desoxirribonucleico (Ortega *et al.*, 2013), por lo que en el presente trabajo nos proponemos determinar el efecto de diferentes concentraciones de ácido giberélico en la propagación *in vitro* de *S. rebaudiana*.



Fig. 1. Plántulas de *Stevia rebaudiana*, "estevia", donadoras de explantes.

Material y métodos

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Papa y Cultivos Andinos, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, ubicada en la avenida Juan Pablo II de la ciudad de Trujillo.

El material biológico, cuya muestra se encuentra registrada en el Herbarium Truxillense (HUT) (Thiers, 2017) con el número 59195, procedió de plántulas *in vitro* de *Stevia rebaudiana*, del Laboratorio

de Biotecnología del Instituto de la Papa y Cultivos Andinos de la Universidad Nacional de Trujillo (Fig. 1).

Las plántulas *in vitro*, fueron manipulados en cámara de flujo laminar utilizando como explantes segmentos de tallo con una yema axilar de aproximadamente 1 cm de longitud. El medio de cultivo empleado fue el MS (1962) con vitaminas, sacarosa (30 g/l), agar (0.8%) y suplementado con ácido giberélico (AG₃) (Tabla 1). El pH se ajustó a 5.8 con NaOH 1N o HCl, llevado a baño maría, servido en

Tabla 1. Concentraciones de ácido giberélico (AG₃) para la mutiplicación *in vitro* de plántulas de *Stevia rebaudiana* "estevia".

Tratamiento	AG ₃ (ppm)
1	0,0
2	0,5
3	1,0
4	1,5



Fig. 2. Diseño de *Stevia rebaudiana* "estevia".

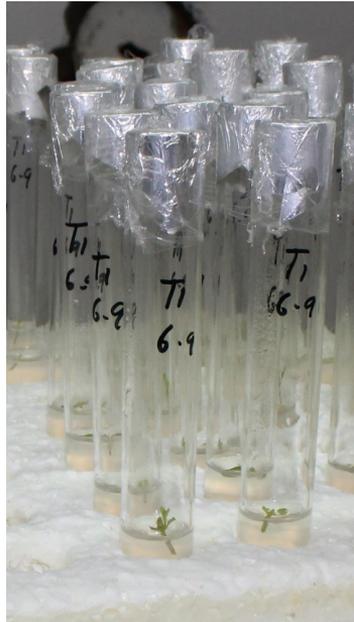


Fig. 3. Crecimiento de yema axilar *Stevia rebaudiana* "estevia".

tubos de ensayo (19 x 98 mm) y tapados con papel aluminio. Fue esterilizado a 121°C y 1 atm de presión durante 20 minutos. Posteriormente, los explantes se colocaron en el cuarto de incubación durante 30 días de 26 ±1°C bajo un régimen de fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

Los brotes nuevos de *Stevia rebaudiana* "estevia", crecieron a partir de las yemas

axilares presentes en los explantes (Fig. 3). La toma de datos, altura de plántula, número de brotes y número de raíces se realizó a los 30 días después de sembradas. Para el análisis estadístico se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA) (Fig. 2), con su análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia del 95% (Steel & Torrie, 1989).



Fig. 4. Plántulas de *Stevia rebaudiana* "estevia", a los 30 días de sembradas.

Resultados y Discusión

Con la finalidad de inducir la proliferación de brotes adventicios a

partir de yemas axilares presentes en los segmentos nodales, estos se cultivaron en diferentes concentraciones de ácido giberélico (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de diferentes concentraciones de ácido giberélico sobre la multiplicación de *Stevia rebaudiana* "estevia", a los 30 días de sembradas.

Tratamiento	Altura (mm)	Nº brotes	Nº raíces
T1	2,892	2,778	0,472
T2	2,628	2,743	0,171
T3	2,572	2,444	0,278
T4	3,003	2,829	0,139

De los resultados obtenidos, todos los medios de cultivo utilizados indujeron la formación de brotes y raíces a partir de los segmentos nodales, no presentando diferencias significativas de acuerdo al análisis de varianza aplicado, aspectos que pueden atribuirse al fenómeno conocido como habituación, dado que las plantas madres donadores de explantes, procedían de cultivos *in vitro* (Torres *et al.*, 1991). El tratamiento T4 presenta un ligero incremento en altura y número de brotes, con 1,5 ppm de AG₃ (Tabla 2), en relación al T1 que es el tratamiento control. Esto contradice a lo obtenido por Lee (2003), en brotes cultivados de anturio, ya que en presencia de 0.5 mg L⁻¹ de ácido giberélico mostraron desarrollo acelerado y alargamiento de los entrenudos de dos variedades, 'Kalapana' con 11.7 mm y 'Midori' 16.7 mm.; pero al cabo de 60 días; con 0.2 mg L⁻¹ de ácido giberélico disminuyó la altura 'Midori' 8.0 mm y 'Kalapana' únicamente 2.5 mm y mostraron los valores más bajos cuando la concentración de ácido giberélico fue de 1.0 mg L., sin embargo Martínez (2016), reporta que los reguladores de crecimiento (6-BAP y AIB), aplicados al medio de cultivo,

causaron una disminución en el número de brotes obtenidos a partir de los segmentos nodales con respecto al tratamiento control donde el promedio por explante fue de 1,93.

Respecto al número de raíces, la presencia de las mismas en todos los tratamientos, nos están indicando la intervención de hormonas endógenas promotoras de raíces, muy frecuente en plantas herbáceas (Barceló *et al.*, 1992); sin embargo, el mayor número de raíces se registró en ausencia de AG₃ (tabla 1), aun cuando no hubo estadísticamente diferencias significativas, aspecto que se explicaría por la intervención normal de hormonas endógenas, tal como se ha reportado para otras especies (Randall *et al.*, 2014).

Conclusión

El ácido giberélico (AG₃), a las concentraciones trabajadas, no ejerce efecto estadísticamente significativo para las variables, altura de planta, número de brotes y número de raíces.

Contribución de los autores

E. L.: Concepción, revisión crítica del proyecto y aprobación de la versión final.

A. L.: Recolección de datos, redacción, análisis e interpretación de los mismos.
A. D. I. C.: Análisis, interpretación de los datos, revisión crítica del texto

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Literatura citada

- Alvarenga, S. & T. Salazar.** 2015. Micropropagación masiva de *Stevia rebaudiana* Bertoni en sistemas de inmersión temporal. *Cultivos Tropicales*, 36 (3): 50-57.
- Barceló, J.; G. Rodrigo; B. Sabater & R. Sánchez.** 1992. *Fisiología Vegetal*. 6ta. Edición. Edit. Pirámide. Madrid, España.
- Durán, S.; M. Rodríguez; K. Cordón & J. Record.** 2012. Estevia (*Stevia rebaudiana*), edulcorante natural y no calórico. *Rev. Chil. Nutr.*, 39 (4): 203-206. versión On-line ISSN 0717-7518 <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182012000400015>.
- Jarma, A.** 2010. Adaptación de dos clones de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) a tres ambientes del Caribe Colombiano. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de Colombia.
- Jeria D. & A. Pozo.** 2011. Estudio del secado convectivo de hojas de *Stevia rebaudiana* y factibilidad técnico-económica de una planta elaboradora de edulcorante a base de stevia. Tesis de Grado. Universidad de Chile.
- Herrera, F.; R. Gómez & C. González.** 2012. El cultivo de *Stevia rebaudiana* Bertoni en condiciones agroambientales de Nayarit, México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Folleto Técnico número 19, Primera Edición. ISBN: 978-607-425-819-6. México. 43 pp.
- Landázuri, P. & J. Tigrero.** 2009. *Stevia rebaudiana* Bertoni, una planta medicinal. Bol. Téc. Edición Especial. ESPE. Ecuador.
- Lee, H.; J. Cruz & B. García.** 2003. Proliferación de Brotes Múltiples y Aclimatación de Anturio (*Anthurium andreaeanum* L.) 'Midori' Y 'Kalapana' cultivados *in vitro*. *Rev. Fitotec. Mex.*, 26 (4): 301 – 307.
- López, E.; E. Gil & A. López.** 2016. Enraizamiento de esquejes de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Asteraceae) "estevia", aplicando dosis creciente de ácido indolbutírico. *Arnaldoa* 23 (2): 569 – 576.
- Martínez, M.** 2015. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Una revisión. *Cultrop*. 36(1): 5-15. La Habana. versión On-line ISSN 1819-4087. Disponible en http://scieloprueba.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-9362015000500001&lng=es&tlng=es. Acceso; 25 de julio del 2017.
- Martínez, D.; A. Urrea; E. Jiménez & L. Atehortua.** 2016. Estrategia para la propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Rev. Biotec. Veg.*, 16 (3): 131 – 142.
- Meienberg F.; L. Sommer; T. Lebrecht; M. Lovera; S. Gonzalez; B. Luig; V. Bremen; K. Steiner; M. Glauser & U. Kienle.** 2015. El sabor agrídulce de la stevia. Publicación de la Declaración de Berna, CEIDRA, Misereor, Pro Stevia Suiza, SUNU, Universidad de Hohenheim (Alemania), Universidad Católica Nuestra Sra. de la Asunción.
- Ortega, L., J. Ocampo, C. Martínez, A. Pérez y J. Sánchez.** 2013. Efecto de las giberelinas sobre el crecimiento y calidad de plántulas de tomate. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud* www.biotecnica.uson.mx Universidad de Sonora. 15(3): 56 - 60.
- Oviedo, D.; S. Alvarenga, S. Evangelista, G. Sepúlveda & M. Rodríguez.** 2015. Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un Cultivo Promisorio para México. *Bio Tecnología*. 19 (2): 14-27.
- Quezada, F.** 2011. Propagación por esquejes de stevia (*Stevia rebaudiana* Bert) en tres sustratos y dos dosis de hormona de enraizamiento bajo invernadero en el Cantón Santa Isabel. Tesis de Grado. Universidad de Cuenca. Ecuador.
- Randall, C.; D. Flores, L. Alvarado, A. Schmidt, C. Alvarado.** 2014. Cultivo *in vitro* del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Fenotipo naranja) proveniente de Costa Rica. *Tecnología en Marcha*. Revista VI Encuentro de Investigación. 45-55.
- Salazar T.** 2014. Caracterización de los sitios de cultivo potenciales en Costa Rica para la especie *Stevia rebaudiana* Bertoni. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Salvador, R.; M. Sotelo & L. Paucar.** 2014. Estudio de la *Stevia rebaudiana* Bertoni como edulcorante natural y su uso en beneficio de la salud. *Scientia Agropecuaria* 5 (3): versión impresa ISSN 2077-9917.
- Steel H. & J. Torrie.** 1989. *Bioestadística*. McGraw-Hill Co. México.
- Suarez, I. & I. Quintero.** 2014. Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un endulzante natural a

través de explantes con meristemas pre-existentes.
Rev. Colomb. Biotecnol., 16 (1): 29-33.

- Taiariol, D. & N. Molina.** 2010. Alternativas Productivas. Producción de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Ka'a He'è) en Bella Vista (Corrientes). Análisis técnico y económico de una alternativa sustentable. EEA INTA Bella Vista, Argentina. Publicación Técnica N° 37 ISSN 1515-9299. 17 pp.
- Thiers, B.** 2017. Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Disponible: <http://sweetgum.nybg.org/science/ih/>. Acceso: 28 agosto 2017.
- Torres, A.; L. Styer & J. Amauri.** 1991. Cultura de tejidos e transformacao Genética de Plantas. Vol II. Servicio de producao de informacao-SPI. Brasilia. DF.
- Vázquez L.** 2012. Cultivo *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. México.
- Vázquez, L.; A. Robledo; A. Muratalla & V. Conde.** 2014. Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni y detección de steviósidos. Bioagro 26(1): 49-56.